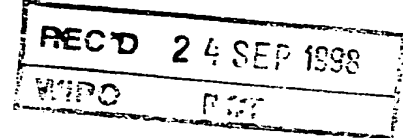


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



3

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



09 / 44 68 08

Bescheinigung

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung
des öffentlichen Rechts in Heidelberg/Deutschland hat eine
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Identifizierung kanzero-
gener Agenzien"

am 24. Juni 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das
Symbol C 12 Q der Internationalen Patentklassifikation er-
halten.

München, den 21. Juli 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

 Ebert

Aktenzeichen: 197 26 824.2

Unser Zeichen: K 2410

Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien.

In Nahrungsmitteln, Kosmetika, Textilien, Werkstoffen, Chemikalien sowie anderen künstlichen Erzeugnissen, aber auch in der Natur, kommen eine Vielzahl bisher unbekannter Substanzen mit kanzerogenem Gefährdungspotential vor, deren Zahl sich durch ständige Neuentwicklungen erhöht. Darüber hinaus können auch physikalische Agenzien (z.B. Röntgenstrahlen, UV-Strahlung) Krebs auslösen. Zur Identifikation dieser Stoffe und Abschätzung ihres kanzerogenen Potentials wurden bisher verschiedene in-vivo und in-vitro Tests durchgeführt.

Der sehr weit verbreitete Ames-Test, auch Salmonella-typhimurium-Test genannt, beruht auf der Mutagenität von Substanzen in Bakterien (Clonfero et al., Med. Lav. 81, S. 3-10 (1990)). Ein ebenso bekannter in-vitro Test ist der SOS-Chromotest (Quillardet et al., Mutat. Res. 297, S. 235-279 (1993)), der auf der Induktion des bakteriellen SOS-Systems durch genotoxische Agenzien beruht. Beide Tests sind in ihrer Sensitivität vergleichbar, haben aber den grundsätzlichen Nachteil, daß die genotoxische Wirkungen von Substanzen in Bakterien und höheren Organismen unterschiedlich sein können und somit die Ergebnisse nicht auf den Säugetierorganismus übertragbar sind. Daher wurden vor wenigen Jahren der Micronucleus-Test (Miller et al., Environ. Mol. Mutagen. 26, S. 240-247 (1995)), der Einzel-Zell-Geltest (SCG-Test, auch Kometen-Assay genannt) und der Test auf Schwester-Chromosomen-Austausch (Hartmann et al., Mutat. Res. 346, S. 49-56 (1995) entwickelt, die alle auf eukaryontischen Zellsystemen basieren.

Zur Untersuchung der mutagenen Wirkung von Substanzen oder physikalischen Agenzien in lebenden Organismen (in vivo) wurden Assays entwickelt, die auf

der Mutation bakterieller Reportergene (LacI- oder lac Z-Gen) beruhen, welche als Transgen in Mäuse eingebracht wurden (Gossen et al., Mutat. Res. 307, S. 451-459 (1994). Daraus entstanden die sog. Muta-Maus sowie die Big-Blue-Maus.

5

10

15

20

25

30

Da die Tumorentstehung ein multifaktorieller und in allen Einzelheiten bisher nicht aufgeklärter Vorgang ist, sind Verfahren unzureichend, die nur einzelne Aspekte (z.B. Mutationserzeugung) der Tumorentstehung analysieren. Im Falle eines negativen Ergebnisses kann damit a priori die Kanzerogenität eines Stoffes oder physikalischen Agens nicht ausgeschlossen werden. Zudem sind die für den Genotoxizitätsnachweis von chemischen und physikalischen Agenzien zumeist verwendeten bakteriellen Systeme nur mit Einschränkungen auf höhere Organismen übertragbar. Es gilt daher festzuhalten, daß nach heutigem Stand der Technik nur die Tumorentstehung selbst ein sicherer Parameter ist, um das kanzerogene Gefährdungspotential eines chemischen oder physikalischen Agens zu ermitteln. Aus diesem Grund wurden schon vor vielen Jahren direkte Kanzerogenitäts-Tests an Nagetieren eingeführt. Bei diesen in vielen Ländern für die Zulassung neuer Substanzen vorgeschriebenen Tests müssen jedoch oft sehr hohe Dosen der betreffenden Substanz appliziert werden, um keine falsch negativen Ergebnisse zu erhalten. Es wurde daher der wichtige Einwand erhoben, daß die erzielten positiven Ergebnisse nicht durch eine echte Kanzerogenität der Substanzen ausgelöst werden, sondern daß lediglich eine unspezifische Stimulierung der Zellteilung infolge der Überdosierung vorliegt. Erst durch diese mitogene Aktivierung würden Mutationen und in der Folge Krebs entstehen, so daß auch mit diesen Tests, die falsch positive Ergebnisse liefern, keine verlässlichen Ergebnisse über die Kanzerogenität von Substanzen erhalten werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem kanzerogene Agenzien zuverlässig identifiziert werden können.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird unter Verwendung eines Säugetiers, bevorzugt eines Nagetiers, besonders bevorzugt unter Verwendung einer Maus, durchgeführt, bei welchem eine Störung in der DNA-Reparatur vorliegt. Die Störung in der DNA-Reparatur basiert auf der trans-dominanten Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (abgekürzt PARP), einem an DNA-Reparaturvorgängen beteiligten Enzym. Die Hemmung der PARP beruht bevorzugt auf Expression einer dominant negativen Mutante der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, bevorzugt der transgenen Expression einer solchen Mutante in einem Säugetier, wodurch ein transgenes Tier entsteht, das auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist. Die PARP besitzt eine DNA-Bindungsdomäne (abgekürzt DBD), welche die Bindung an DNA-Strangbrüche ermöglicht und zu einer Enzymaktivität der PARP führt, wodurch eine Reparatur der Strangbrüche ermöglicht wird. Bei der dominant negativen PARP-Mutante liegt jedoch eine Deletion vor, so daß nur die DNA-Bindungsdomäne der PARP exprimiert wird. Dies bewirkt eine Hemmung der PARP-Enzymfunktion und damit der DNA-Reparatur. Die Expression dieser PARP-Mutante hat keinen Einfluß auf Zellteilung und Zellvitalität in Abwesenheit von genotoxischem Stress. Werden aber genotoxische (chemische oder physikalische) Agenzien appliziert, führt die PARP-Hemmung zu einer erheblichen Steigerung der Sensitivität der Zellen gegen diese Behandlungen. Die Anwesenheit der PARP-Mutante führt dann zu einer gesteigerten genetischen Instabilität nach Kanzerogenbehandlung, die sich in erhöhter Rekombination sowie verstärkter Genamplifikation äußert. Außerdem führt die Störung der PARP-Funktion zu einer gesteigerten Mutagenität genotoxischer Agentien. Damit führt die Störung der zellulären PARP-Funktion zu einer erhöhten Rate verschiedener genetischer Veränderungen (Mutationen, Rekombinationen, Genamplifikation) nach Behandlung mit einem Kanzerogen. Diese verschiedenen genetischen Veränderungen lassen, in Abhängigkeit von der Natur des kanzerogenen Agens und der Art seiner Applikation, verschiedene Wege der Tumorentstehung zu (z.B. Onkogenamplifikation, Tumorsuppressorgen-Mutation oder Kombinationen davon).

Das bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Säugetier, bevorzugt die

transgene Maus, hat vorteilhafterweise eine Haut-spezifische Expression der dominant-negativen PARP-Mutante, wobei selbstverständlich auch jede andere organspezifische Expression möglich ist. Die Haut ist aber wegen der guten Erreichbarkeit und Kontrollierbarkeit das bevorzugte Organ für Kanzerogenese-Untersuchungen. Zur Steuerung des Transgens kann jeder dem Fachmann bekannte Promotor, der eine gewebespezifische Expression, bevorzugt in der Haut, erlaubt, verwendet werden; bevorzugt wird der Zytokeratin-14-Promotor verwendet, der eine Expression in der zellteilungsaktiven Basalschicht gestattet, aus welcher bevorzugt Hauttumoren entstehen (Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, S. 1563-1567 (1989)).

In bevorzugter Weise wird zur Herstellung des transgenen Säugetiers ein Fragment verwendet, das folgenden Aufbau hat (s. Fig. 1):

- 15 - 1,946 kB Aval-Fragment des humanen Zytokeratinpromotors (Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, S. 1563-1567 (1989))
- 1,156 kB DBD-Fragment von Position -29 bis zur internen Nla IV-Stelle bei 1127 der humanen Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (Cherney et al., Proc. natl. Acad. Sci. USA 84, S. 8370-8374 (1987))
- 20 - 0,486 kB des Polyadenylierungssignals des humanen Zytokeratinpromotors (Vassar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, S. 1563-1567 (1989))

Ein dieses Fragment enthaltender Vektor (pKDinoDBD) wurde am 11. Juni 1997 unter der Nummer DSM 11594 bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) hinterlegt.

Das transgene Säugetier wird nach der von Hogan et al. ("Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1986)) allgemein beschriebenen Methode hergestellt. Dazu eignet sich besonders die Mikroinjektion eines entsprechenden DNA-Fragments in befruchtete Maus-Oozyten und nachfolgende Implantation in scheinträchtige Weibchen. Es

entstehen Nachkommen, die das Transgen enthalten und an ihre Nachkommen weitergegeben (DBD-Linie).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in Form eines in-vivo-Assays durchgeführt. Es werden 10-15 Wochen alte transgene Tiere der DBD-Linie ausgesucht und für den Test entsprechend akklimatisiert. Für jede Behandlung werden 10-15 Tiere (weiblich oder männlich) benötigt. Da ein wichtiges Zielorgan der Kanzerogenesestudien die Haut ist, werden die potentiell kanzerogenen chemischen Agenzien in jeweils 50-200 μ l Lösungsmittel, z.B. Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Aceton oder Ethanol) zweimal pro Woche topisch aufgetragen. Zur Untersuchung von potentiell karzinogenen physikalischen Agenzien werden entsprechende Applikationen ebenfalls zweimal pro Woche durchgeführt. Diese Behandlungen können bis zu 20 Wochen dauern. Um Tumorstadium zu ermöglichen, wird eine zusätzliche Zeit von bis zu 40-80 Wochen nach der letzten Applikation veranschlagt. Als Positivkontrolle für die Tumorerzeugung kann 5-50 μ g 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) in derselben Versuchsanordnung verwendet werden. Als Negativkontrolle kann das entsprechende Lösungsmittel, das auch zur Auflösung der Testsubstanz verwendet worden war, aufgetragen werden. Die Tiere werden während der gesamten Versuchszeit regelmäßig gewogen und die Applikationsstelle untersucht. Entstehende Papillome bzw. andere Hauttumoren werden einmal pro Woche makroskopisch untersucht und ggf. vermessen. Wenn Tumore eine kritische Größe erreicht haben (hängt von Tierart, Lage des Tumors und den nationalen Tierschutzbedingungen ab), werden die Tiere getötet und Tumorgewebe wird zur histologischen und molekularbiologischen Charakterisierung entnommen. Außerdem können Primärkulturen der Tumoren angelegt werden. Die Ergebnisse des Kanzerogenitätsversuche werden statistisch ausgewertet, wobei Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden können. Zur weiteren Analyse können Unterschiede der Tumorentstehung in den Geschlechtern sowie zu Wildtyp-Mäusen ermittelt werden. Weitere Einzelheiten zu in-vivo Kanzerogenitätsassays finden sich in Tennant et al., Environ. Health Perspect. 103, S. 942-950 (1995).

Im Vergleich zu allen in-vitro-Modellen, welche einzelne Vorgänge der Tumorentstehung herausgreifen (z.B. DNA-Schädigung, Mutationserzeugung) ist ein in-vivo-Assay aussagekräftiger, dessen biologischer Endpunkt die Tumorentstehung selbst ist. Im Vergleich zu dem oben beschriebenen direkten Kanzerogenitäts-Modell mit Nagetieren kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung des transgenen Säugetiers, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch trans-dominante Hemmung der PARP-Aktivität aufweist, ein Sensitivitätsgewinn erzielt werden, wodurch das Problem der Überdosierung und Erzeugung falsch positiver Ergebnisse verringert wird. Im Gegensatz zu den bekannten transgenen Mausmodellen umgeht das Verfahren der vorliegenden Erfindung das Problem der Bahnung in Richtung einer vorgegebenen Tumorgenese. Die PARP-Hemmung führt zu einer grundlegenden Störung der DNA-Reparatur mit der Konsequenz einer Verstärkung der genetischen Instabilität (Mutations-, Rekombinations-, Genamplifikationsrate) nach Kanzerogenbehandlung, wodurch dann über verschiedene Wege die Tumorentstehung begünstigt wird.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben.

Fig. 1 zeigt das Expressionsfragment aus pKDinoDBD

20	K14-Prom.	=	Promotor des humanen Zytokeratin-14-Gens
	DBD	=	kodierende Sequenz der DNA-Bindungsdomäne der humanen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (EC 2.4.2.30)
25	p-A	=	Polyadenylierungssignal des humanen Zytokeratin-14-Gens

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

BEISPIEL 1: Herstellung der transgenen Mauslinie DBD # 354

Das Plasmid pKDinoDBD (s. Fig. 1) wurde mit dem Restriktionsenzym Not I geschnitten. Nach Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem 1%igen Agarosegel wurde ein 3,6 kB großes Fragment, welches die Expressionskassette von pKDinoDBD enthielt, isoliert und mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (z.B. "Gene Clean"[®]; Dianova, Hamburg) nach den Angaben des Herstellers präpariert. Dieses Fragment wurde auf eine Konzentration von 2 ng/ μ l in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,25 mM EDTA eingestellt. F1-Weibchen aus der Kreuzung der Mäusestämme C57BL/6 x DBA2 wurden durch Hormongaben einer Superovulation unterzogen. Nach der Verpaarung mit F1-Männchen (ebenfalls durch Kreuzung von C57BL/6 x DBA2) wurden befruchtete Eizellen aus den Weibchen präpariert, in die das vorstehend beschriebene DNA-Fragment mikroinjiziert wurde. Die Embryonen wurden in die Eileiter scheinträchtiger NMRI-Mäuse (Ammenmütter; zuvor verpaart mit vasektomierten Männchen) implantiert. Die nach ca. 21 Tagen geborenen Tiere wurden anhand von DNA-Material aus Schwanz-Biopsien auf Anwesenheit des Transgens überprüft. Dazu wurde die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit folgenden Primern aus der kodierenden Sequenz der humanen PARP (Cherney et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, S. 8370-8374 (1987)) eingesetzt:

5'-ATG GCG GAG TCT TCG GAT AAG CTC TA-3' (Primer 1, # 1-26)

5'-GCC AGG CGT GGC CGC CAC GGA GG-3' (Primer 2, # 1110-1088)

Es wurden 22 PCR-Zyklen mit jeweils 200 ng genomischer DNA durchgeführt, wobei jeweils 300 sec. bei 95°C denaturiert, 60 sec. bei 60°C angelagert und 120 sec. bei 72°C polymerisiert wurde.

Ein positives Weibchen (Ohrmarke #354) wurde identifiziert. Aus der Schwanz-Biopsie dieses Tieres wurde Protein-Material gewonnen und mittels Western Blot auf Expression des Transgens untersucht. Dabei wurden sowohl der monoklonale anti-DBD-Antikörper CII10 (Lamarre et al., Biochim. Biophys. Acta 950, S.

147-160 (1988)) als auch das gegen die DBD gerichtete anti-FII-Kaninchenserum (Küpper et al., J. Biol. Chem. 265, S. 18721-18724 (1990)) eingesetzt. Mit beiden Antikörpern war die 45 kDa große DNA-Bindungsdomäne (DBD) im Western Blot nachweisbar, so daß der Beweis für die Expression des Transgens erbracht wurde. Die Founder-DBD-Maus #354 wurde mit DBA2-Männchen verpaart und die Nachkommenschaft analysiert. Das Transgen wird an die Nachkommen weitergegeben, so daß die Linie DBD #354 stabil vorhanden ist.

BEISPIEL 2: Identifizierung des kanzerogenen Potentials von fünf verschiedenen Chemikalien

12 Wochen alte Tiere der in Beispiel 1 beschriebenen Maus-DBD-Linie #354 werden über drei Wochen einer Akklimatisation an den Versuchsort unterzogen. Weibliche Tiere werden in Gruppen zu jeweils 5 Tieren/Käfig, männliche Tiere werden einzeln unter spezifisch pathogenfreien (SPF)-Bedingungen gehalten. Die Ernährung der Tiere erfolgt nach Standard (#D10010 Futter von Research Diets, New Brunswick, New Jersey, USA sowie Wasser ad libitum). Für jede Behandlung werden 10-15 Tiere (männlich oder weiblich) benötigt. Die zu testenden putativ karzinogenen Chemikalien werden in mehreren Verdünnungsstufen in physiologischer Kochsalzlösung bzw. Aceton aufgenommen und 100 µl jeder Verdünnung jeweils zweimal pro Woche topisch aufgetragen. Als Positivkontrolle werden 20 µg 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) in 100 µl Aceton verwendet. Als Negativkontrolle wird Aceton appliziert. Die Behandlung wird für 15 Wochen durchgeführt. Die Tiere werden wöchentlich gewogen und an der Applikationsstelle untersucht. 12 Wochen nach Ende der Behandlungen kann in der Gruppe der Positivkontrolle mit einem sichtbaren Tumorwachstum gerechnet werden, wobei erfahrungsgemäß die Tumoren rasch (innerhalb weiterer 12 Wochen) an Größe zunehmen. Nach Erreichen einer kritischen Tumorgroße werden die Tiere jeweils durch zervikale Dislokation getötet und der Tumor entnommen. Erwartungsgemäß zeigt sich in der Gruppe der mit Lösungsmittel-behandelten Tiere auch nach 60 Wochen kein Tumorwachstum.

Alternativ kann ein sogenanntes Initiations-Promotionsprotokoll zur Anwendung kommen. Im Prinzip wird hierbei einmalig eine sehr niedrige Dosis eines initiierenden (zumeist DNA-schädigenden) Karzinogens verabreicht, gefolgt von wiederholten Anwendungen eines für sich allein nicht-karzinogenen Tumorpromotors (Becker et al., Cancer Res. 56, S. 3244-3249, 1996). Hier wird als Positivkontrolle beispielsweise Methylnitrosoharnstoff ($20 \mu\text{mol}$ in $100 \mu\text{l}$ Aceton; einmalig topisch appliziert) verwendet. Sieben Tage später wird dann mit dem Tumorpromotor Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 22 Wochen weiterbehandelt (je 10 mmol in $100 \mu\text{l}$ Aceton). Negativkontrollen sind hier Tiere, die anstelle des Methylnitrosoharnstoff lediglich Aceton erhalten haben, dann jedoch gefolgt von der üblichen TPA-Behandlung. Die auf Kanzerogenität zu testenden Chemikalien werden ebenfalls anstelle des Methylnitrosoharnstoffs appliziert, wiederum gefolgt von der üblichen TPA-Behandlung. Bei diesem Protokoll ist bei der Positivkontrolle nach spätestens 9 Wochen mit einem sichtbaren Tumorwachstum bei in Beispiel 1 beschriebenen Maus der DBD-Linie #354 zu rechnen.

Patentansprüche

- 5 1) Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agenzien, wobei die potentiell kanzerogenen Agenzien einem Säugetier, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aufweist, verabreicht werden.
- 10 2) Verfahren nach Anspruch 1; wobei die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase durch Expression einer dominant negativen Poly (ADP-Ribose)-Polymerase verursacht wird.
- 15 3) Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase durch einen transgenen Eingriff vorgenommen wird.
- 20 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei als Säugetier eine transgene Maus verwendet wird.
- 5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verabreichung der potentiell kanzerogenen Agentien durch topische Applikation erfolgt.
- 6) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Säugetier das in Fig. 1 gezeigte DNA-Konstrukt transgen exprimiert.
- 25 7) Verwendung eines Säugetiers, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aufweist, zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
- 30 8) Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase durch Expression einer dominant negativen Poly (ADP-Ribose)-Polymerase verursacht wird.

- 9) Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, wobei es sich bei dem Säugetier um eine transgene Maus handelt.

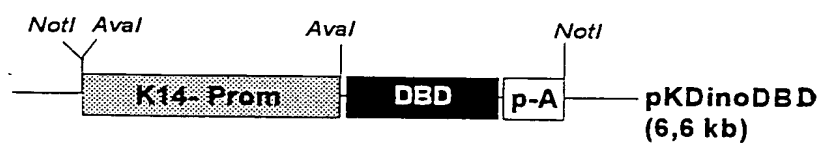
Zusammenfassung

5

Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung kanzerogener Agentien, wobei die potentiell kanzerogenen Agenzien einem Säugetier, das eine Störung in der DNA-Reparatur durch Hemmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase aufweist, verabreicht werden.

10

Fig. 1



1 kb

Expressionskassette

—

Vektor-Anteil